Thymidine Kinase 1 (TK1) 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

王云龙 [1, 2]，赵二霞 [1]，李玉林 [2] 等

（1.郑州大学生命科学学院，河南 郑州 450001；2.河南省生物工程技术研究中心，河南 郑州 450001；3.郑州市生物制药重点实验室，河南 郑州 450001）

（2.

摘要：为获得具有免疫原性的 TK1 重组蛋白。通过构建能够表达 TK1 蛋白的重组菌 BL21-pET32a-TK1,采用大肠杆菌 pET32a 表达系统，优化 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间使 BL21-pET32a-TK1 重组菌表达目的蛋白的作用条件最佳。表达产物用镍离子亲和层析纯化获得 TK1 蛋白，并用 SDS-PAGE 和 western blot 进行检测。用 TK1 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体，检测蛋白免疫原性。实验结果表明：成功构建能够表达 TK1 蛋白的重组菌 BL21-pET32a-TK1，在 37℃条件下，IPTG 浓度为 0.2mM/L、诱导 6h 时重组蛋白 TK1 表达量最高。镍离子亲和层析梯度洗脱在 80mM 咪唑条件下 TK1 蛋白纯度最大，灰度分析为 87.3%，浓缩后蛋白浓度为 5.96mg/ml。用该蛋白制备杂交瘤共获得 10 株稳定分泌 TK1 抗体的阳性单克隆细胞株，表明 TK1 重组蛋白具有较好的免疫原性。本实验成功获得可溶性、抗原活性高、免疫原性强的 TK1 重组蛋白，为肿瘤科学及临床应用研究提供物质支撑。

关键词：重组菌，TK1，表达条件优化，亲和层析，单克隆抗体[1]

Expression , purification and identification of thymidine kinase 1 recombinant protein

WANG Yun-long[1,2]，ZHAO Er-xia[1]，LI Yu-lin [2] et al

(School of Life Science ,Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450001 ; Henan Biotechnology Research Center, Henan Zhengzhou 450001; Zhengzhou Biopharmaceutical Key Laboratory, Henan Zhengzhou 450001)

Abstract: In order to obtain the TK1 recombinant protein with immunogenicity. The target gene was amplified by PCR, double digested with *Xho*I / *Eco*RI restriction endonuclease, linked to the expression vector pET32a, and then transferred into competent cells to prepare BL21-pET32a-TK1 recombinant strain. The TK1 protein was expressed by IPTG induced BL21-pET32a-TK1 recombinant bacteria and optimized from IPTG concentration, culture temperature and time. The expression level of recombinant protein TK1

基金项目：河南省科技攻关项目（162102310008）

作者简介：赵二霞，女，硕士，研究方向：生物化 学与分子生物学; E-mial: biozex@126.com

通讯作者：王云龙，男，教授，研究方向：生物制药; E-mial: biowyl@126.com

was tested by SDS-PAGE, and determined the optimal induction conditions. The expressed product was purified by nickel ion affinity chromatography, used SDS-PAGE to detect the purity of the target protein , and the antigenicity of the target protein was detected by western blot. Used the obtained TK1 recombinant protein to immunize the mice, took the spleen cells of the best immune effect mice to fuse with SP2/0. Screened monoclonal cell lines that secreting specific antibodies stably. And then detected the subtype and specificity of antibody. The experimental results showed that the condition of 37 ℃,when the concentration of IPTG was 0.2mM/L and induced for 6h meanwhile, the recombinant protein expression quantity of TK1 was highest. Under the condition of nickel ion affinity chromatography gradient elution, in 80mM imidazole, the content of recombinant protein TK1 was the highest purity. It was 87.3%. After concentrating, the protein concentration was 5.96mg/ml. With indirect ELISA detection ,10 strains of cell that can stable secretion specificity TK1 antibody by hybridoma technology were obtained. this suggests that TK1 recombinant protein have immunogenicity. It can provide the material base for the clinical research of related tumors.

Key Words: recombinant bacteria,thymidine kinase 1,expression,affinity chromatograph, monoclonal antibody

胸苷激酶 1[1]（thymidine kinase 1，TK1）在镁离子（Mg^{2+}）和 ATP 参与的条件下可磷酸化脱氧胸苷为脱氧胸苷一磷酸,是 DNA 补救合成途径的关键酶。TK1 存在于细胞质中，呈细胞周期依赖性 [2-4]。正常成人细胞中 TK1 含量极低（＜2 pmol/L），只有细胞过度增殖的情况下 TK1 浓度才会升高释放至体液，导致血清胸苷激酶 1（STK1）水平增加[5]。因此，TK1 可作为肿瘤细胞标志物用于乳腺癌、肠胃癌、鼻咽癌、原发性肝癌等不同类型恶性肿瘤的早期检测，评估手术、放化疗等治疗效果及肿瘤复发风险等[6-15]。目前获得 TK1 抗原一方面通过多肽段的合成，多肽合成不仅获得的抗原数量有限，而且为了获得较强的免疫原性需要偶联生物大分子，由于无关蛋白的引入也为单抗的筛选带来新问题。另一方面采用 pET28a-TK1 重组载体原核表达 TK1 蛋白，pET28a 不能很好的实现蛋白的可溶性表达，在变性复性的过程中容易使蛋白失活。为了获得更加优质的 TK1 蛋白，本实验探索构建重组菌，采用大肠杆菌 pET32a 表达系统，通过优化 IPTG 浓度、温度、时间使 BL21-pET32a-TK1 重组菌表达目的蛋白的作用条件最佳、产物经镍离子亲和层析纯化后获得高纯度的 TK1 蛋白，经动物免疫制备单克隆抗体初步验证 TK1 重组蛋白的免疫原性和生物活性达到实验要求，为肿瘤科学及临床应用研究提供了物质支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

从 GenBank 搜索人 TK1 基因序列，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。TK1 抗体、表达载体 pET32a 购自生工生物工程（上海）股份有限公司，表达菌 BL21、BALB/c 小鼠、HRP 标记兔抗鼠-IgG 抗体由河南省生物工程技术研究中心提供，TK1 阳/阴性血清取自郑州大学第一附属医院。

Primer name	Primer sequence (5′–3′)	restriction enzyme
5′-Primer	GGAATTCCATATGAGCTGCATTAACCTG CCCA	*Eco*RI
3′-Primer	CCGCTCGAGTCAGTTGGCAGGGCTGCA	*Xho*I

1.2 主要试剂

甲叉双丙烯酰胺、β-巯基乙醇、TEMED 购自 sigma，DNA Marker、ECL 发光液购自北京康为世纪生物科技有限公司，IPTG、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho*I、*Eco*RI 购自 TaKaRa，预染蛋白 Marker 购自国药集团化学试剂有限公司，PVDF 膜购自 Millipore。

1.3 方法

1.3.1 BL21-pET32a-TK1 重组菌的构建

（1) PCR 扩增目的基因 反应条件：93℃预变性 5min，93℃变性 30s，60℃复性 30s，72℃延伸 40s，共 30 个循环，72℃延伸 5min。扩增产物用 0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定后用胶回收试剂盒回收。

（2）目的基因片段和 pET32a 表达载体在 37℃条件下用 *Eco*RI、*Xho*I 双酶切 2h，鉴定后胶回收，在 16℃、T4DNA 连接酶条件下过夜反应，转入感受态细胞 BL21，挑取阳性单菌落，双酶切鉴定后送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.3.2 重组菌初步诱导

将鉴定正确的 BL21-pET32a-TK1 大肠杆菌和转入空质粒的 BL21-pET32a 大肠杆菌（对照）同时进行诱导，确定是否有 TK1 蛋白表达以及表达形式。

（1）分别挑取 BL21-pET32a-TK1 和 BL21-pET32a 单菌落，扩大培养至 A600 为 0.6-0.8。

（2）取 1ml 菌液做对照（未诱导），剩余菌液加 IPTG 至终浓度为 1mM，37℃、180rpm 震荡培养 4h。

（3）8 000rpm、离心 5min 分别收取菌体和上清，用 PB 重悬菌体。

（4）超声波破碎菌体、10 000rpm、离心 10min，分别收取沉淀和上清。

1.3.3 初步诱导后 SDS-PAGE 检测

以未诱导的 BL21-pET32a-TK1 大肠杆菌菌液、IPTG 诱导的 BL21-pET32a 大肠杆菌菌液与 IPTG 诱导的 BL21-pET32a-TK1 大肠杆菌菌液做对照，对上述收取的样品处理后以 5%浓缩胶，15%分离胶进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.4 重组菌诱导表达条件优化

分别从 IPTG 作用浓度、培养温度、培养时间三个因素对 BL21-pET32a-TK1 重组菌进行诱导表达，对超声破碎后菌液上清进行 SDS-PAGE 检测确定最佳表达条件。

（1）37℃、诱导 6h，IPTG 浓度设定 0.1mM、0.2mM、0.5mM、1.0mM 、1.5mM 5 个水平[16]，确定 IPTG 作用浓度。

（2）用上述实验确定的最佳 IPTG 作用浓度、诱导 6h，温度设定 25℃、30℃、37℃、40℃ 4 个水平，确定培养温度。

（3）用上述实验确定的最佳 IPTG 作用浓度、培养温度，时间设定 2h、4h、6h、8h 4 个水平，确定培养时间。

1.3.5 纯化 TK1 蛋白

（1）根据优化后的条件对重组菌进行诱导表达，8 000rpm、离心 5min，收集菌体。冰浴条件下超声破碎（400W，工作 5s，间歇 5s，循环 15min），10 000rpm、离心 10min 后取上清。

（2）用 AKTAprime Plus 蛋白纯化仪纯化 TK1 蛋白，柱压限定小于 0.3Mpa。上样前依次用 0.5M NaOH(含 0.05M EDTA)、超纯水、3%硫酸镍、超纯水、PB（0.02M、PH7.8）将镍亲和层析柱[17-19]进行处理。上样流速为 1ml/min，上样完成后用 0、 20、50、80、100、200mM 咪唑蛋白洗脱液进行梯度洗脱，收集洗脱样品进行 SDS-PAGE 检测，并测其蛋白浓度。

1.3.6 Western blot 检测蛋白抗原性

纯化的 TK1 蛋白样品处理后进行 SDS-PAGE 电泳，切下目的条带凝胶，转膜。将 PVDF 膜置于封闭液中封闭 2h，加入 1：4000 稀释的 TK1 抗体 37℃孵育 2h。加入 1：4000 稀释的兔抗鼠-IgG 酶标二抗 37℃孵育 1h，显色[20]。

1.3.7 制备多克隆抗体检测蛋白免疫原性

用获得的 TK1 重组蛋白添加佐剂腹腔免疫 6-8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠 3 只，每次 100ug/只，第三次免疫后用 ELISA 间接法（每孔包被 TK1 重组蛋白 100ng，兔抗鼠-IgG 酶标二抗 1：4000 稀释），通过倍比稀释检测小鼠抗体血清效价。

1.3.8 筛选阳性单克隆细胞株

选用免疫效果最好的小鼠，脾内加强免疫（20ug）后取其脾细胞和 SP2/0 细胞融合，通过有限稀释法、克隆化和 ELISA 检测（同 1.3.7）筛选出能稳定分泌抗 TK1 抗体的阳性单克隆细胞株[21]。

1.3.9 TK1 单抗鉴定

（1）单抗亚型的鉴定 按照鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒操作说明对上述筛选的阳性单克隆细胞株进行鉴定。

（2）特异性检测 通过包被 Trx 蛋白（100ng/孔）、TK1 标准品（50ng/孔），采用 ELISA 间接法（兔抗鼠-IgG 酶标二抗 1：4000 稀释）检测 10 株单抗的特异性。

（3）竞争抑制实验 取 10 株阳性单克隆细胞株培养上清，各处理三份：样品稀释液稀释、上清与 TK1 阳性血清混合、上清与 TK1 阴性血清混合。确定该抗体是否仅与血清中 TK1 抗原结合。

2 结果与分析

2.1 BL21-pET32a-TK1 重组菌的构建

目的基因扩增后经 0.7%琼脂糖凝胶电泳检测在约 700bp 处有目的条带，与预期结果相符（图 1）。重组质粒双酶切鉴定在约 700bp 处有目的条带和质粒条带，与预期结果相符（图 2）。



图 1：目的基因扩增

Fig. 1: PCR of purpose gene

1：DNA Marker；2：TK1 目的条带

1：DNA Marker；2：TK1 fragment

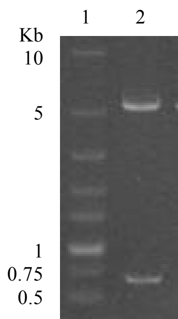


图 2：pET32a-TK1 质粒双酶切鉴定

Fig. 2: Double digestion recombinant plasmid pET32a-TK1

1：DNA Marker；2： pET32a-TK1 质粒双酶切

1：DNA Marker；2：Double digestion of pET32a-TK1 plasmid

2.2 重组菌初步诱导 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 检测实验结果显示（图 3）：在 37℃、1.0 mM IPTG 作用浓度下诱导 4h 目的蛋白为可溶性表达。

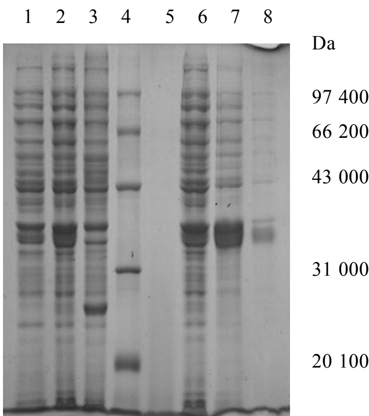


图 3：TK1 蛋白初步诱导 SDS-PAGE 检测

Fig. 3: SDS-PAGE detection of TK1 protein preliminary induced

1：诱导前 BL21-pET32a-TK1；2：诱导后 BL21-pET32a-TK1；3：诱导后 BL21-pET32a；4：蛋白 Marker；5：诱导后上清；6：诱导后菌体；7：超声破碎后离心上清；8：超声破碎后离心沉淀

1：Before induction of BL21-pET32a-TK1；2：After induction of BL21-pET32a-TK1；3：After induction of BL21-pET32a；4：Protein Marker；5：Bacteria liquid centrifugal supernatant after induction；6：After induction of bacteria；7：centrifugal supernatant after ultrasonication；8：Centrifugal sedimentation after ultrasonication

2.3 重组菌诱导表达条件优化

（1）IPTG 作用浓度确定：37℃、诱导 6h，通过改变 IPTG 浓度所得实验结果如图 4，灰度分析结果如图 5。结果显示 IPTG 在 0.2 mM 之后，增大浓度对蛋白表达量影响不大，确定 IPTG 诱导浓度为 0.2mM。

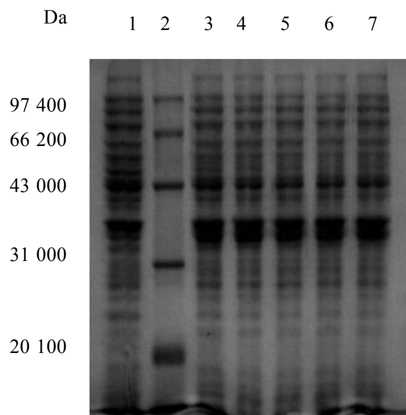


图 4：IPTG 浓度优化 SDS-PAGE 检测

Fig. 4: SDS-PAGE detection of IPTG concentration optimization

1：诱导前 BL21-pET32a-TK1；2：蛋白 Marker；3：IPTG 0.1mM；4：IPTG 0.2mM；5：IPTG 0.5mM；6：IPTG 1.0mM；7：IPTG 1.5mM

1：Before induction of BL21-pET32a- TK1；2：Protein Marker；3：IPTG 0.1mM；4：IPTG 0.2mM；5：IPTG 0.5mM；6：IPTG 1.0mM；7：IPTG 1.5mM

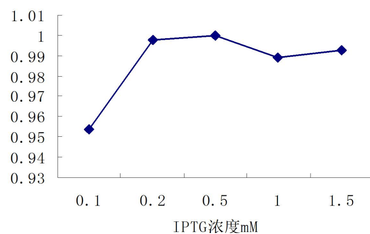


图 5：不同浓度 IPTG 灰度分析

Fig. 5: Gray analysis of Different IPTG concentration

（2）诱导温度确定：0.2mM IPTG、诱导 6h，通过改变诱导温度所得实验结果如图 6，灰度分析结果如图 7。结果显示温度在 37℃时目的蛋白 TK1 表达量最高。

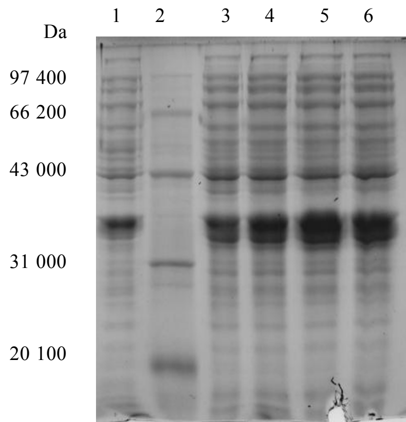


图 6：诱导温度优化 SDS-PAGE 检测

Fig. 6: SDS-PAGE detection of induction temperature optimization

1：诱导前 BL21-pET32a-TK1；2：蛋白 Marker；3：25℃；4：30℃；5：37℃；6：40℃

1：Before induction of BL21-pET32a- TK1；2：Protein Marker；3：25℃；4：30℃；5：37℃；6：40℃

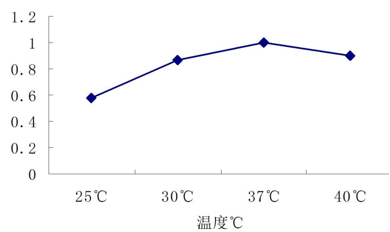


图 7：不同温度灰度分析

Fig. 7: Gray analysis of Different induction temperature

（3）诱导时间确定：37℃、0.2mM IPTG 作用浓度下，通过改变诱导时间所得实验结果如图 8，灰度分析结果如图 9。结果显示诱导 6h 时目的蛋白 TK1 表达量最高。

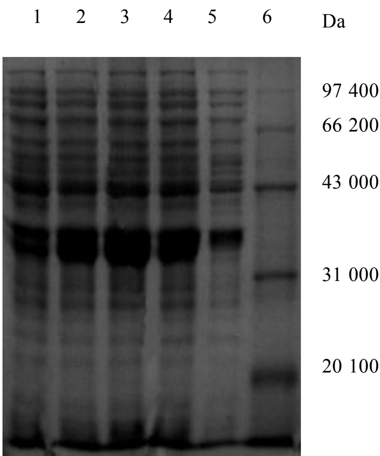


图 8：诱导时间优化 SDS-PAGE 检测

Fig. 8: SDS-PAGE detection of induction time optimization

1：2h；2：4h；3：6h；4：8h；5：诱导前 BL21-pET32a-TK1；6：蛋白 Marker；

1：2h；2：4h；3：6h；4：8h；5：Before induction of BL21-pET32a- TK1；6：Protein Marker

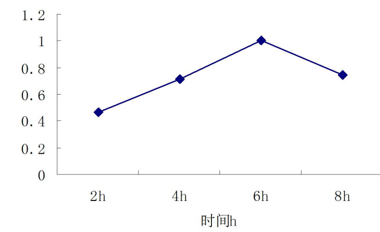


图 9：不同时间灰度分析

Fig. 9: Gray analysis of Different induction time

综上：该实验在 37℃、IPTG 作用浓度为 0.2mM 条件下，诱导 6h 目的蛋白 TK1 表达量最高。

2.4 纯化 TK1 蛋白

表达产物经镍离子亲和层析纯化，SDS-PAGE检测在36KDa有明显的蛋白条带，灰度分析纯度为87.3%，经紫外分光光度计检测浓度为2.48mg/ml。浓缩后蛋白浓度为5.96mg/ml。

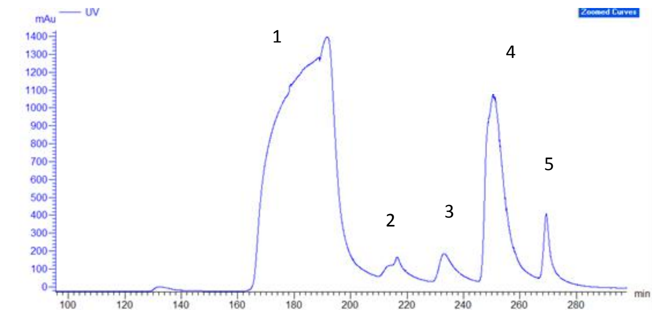


图 10：TK1 蛋白亲和纯化

Fig. 10: Affinity purification of TK1 protein

1：上样；2：20mM 咪唑洗脱峰；3：50mM 咪唑洗脱峰；4：80mM 咪唑洗脱峰；5：100mM 咪唑洗脱峰；

1：upper sample；2：20mM imidazole elution peak；3：50mM imidazole elution peak；4：80mM imidazole elution peak；5：100mM imidazole elution peak

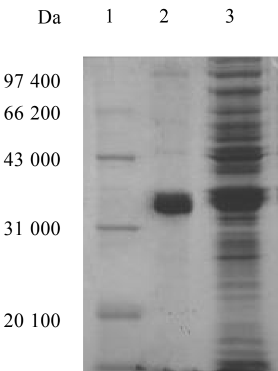


图 11：纯化后 SDS-PAGE 检测

Fig. 11: SDS-PAGE detection of After purification

1：蛋白 Marker；2：80mM 咪唑洗脱蛋白；3：诱导后 BL21-pET32a-TK1

1：Protein Marker；2：80mM imidazole elution protein；3：After induction of BL21-pET32a-TK1

2.5 Western blot 检测蛋白抗原性

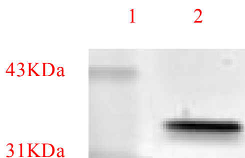


图 12：Western blot 检测

Fig. 12: Western blot test

1：蛋白 Marker；2：TK1 蛋白

1：Protein Marker；2：TK1 protein

2.6 制备多克隆抗体检测蛋白免疫原性

结果显示（表1）免疫后3只小鼠的抗体血清效价均达到1:1.28×10^5，且B小鼠免疫效果最好。

表1：抗体血清效价检测

Table 1：Detection of antibody titer serum

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.432	2.148	2.187	1.784	1.195	0.640	0.352	0.182	0.125	0.039	1.765	0.973
B	2.344	2.079	2.032	1.886	1.338	0.811	0.462	0.253	0.134	0.065	0.045	0.038
C	2.402	1.999	1.805	1.121	0.748	0.378	0.239	0.145	0.101	0.048	0.027	0.020

注：*OD* 值＞0.105 为阳性反应

Note：*OD* > 0.105 as positive response

2.7 筛选阳性单克隆细胞株

单克隆细胞上清液1:1.28×10^{5}稀释后通过ELISA间接法检测（表2），成功筛选出10株阳性单克隆细胞，分别命名为：1D8、1G3、2C10、3B7、3D5、4F9、4G3、5A6、5E3、6D5。

表2：阳性单克隆细胞株ELISA检测

Table 2：ELISA detection of positive monoclonal cell lines

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
cell lines	1D8	1G3	2C10	3B7	3D5	4F9	4G3	5A6	5E3	6D5	+	-
OD	0.306	0.447	0.319	0.405	0.283	0.345	0.371	0.387	0.495	0.222	1.826	0.055

注：+：阳性对照；－：阴性对照；*OD* 值＞0.105 为阳性反应

Note：+：positive control；－：negative control；*OD* > 0.105 as positive response

2.8 TK1 单抗鉴定

亚型鉴定结果如表3，特异性检测结果如表4，竞争性抑制检测结果如表5，表明所得10株单抗仅与TK1抗原特异性结合，可用于检测方法的建立。

表3：阳性单克隆细胞株亚型鉴定

Table 3：Sub-type identification of positive monoclonal cell lines

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cell lines	1D8	1G3	2C10	3B7	3D5	4F9	4G3	5A6	5E3	6D5
Sub-type	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1

表4：阳性单克隆细胞株特异性鉴定

Table 4：Specific identification of positive monoclonal cell lines

	1D8	1G3	2C10	3B7	3D5	4F9	4G3	5A6	5E3	6D5	Ab-TK1	-
Trx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TK1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注：+：阳性反应；－：阴性反应

Note：+：positive response；－：negative response

表5：竞争性抑制检测结果

Table 5：Competitive inhibition test results

	1D8	1G3	2C10	3B7	3D5	4F9	4G3	5A6	5E3	6D5	+	-
A	0.315	0.434	0.322	0.395	0.292	0.331	0.358	0.382	0.459	0.216	0.325	0.043
B	0.039	0.048	0.045	0.047	0.036	0.039	0.047	0.044	0.042	0.037	0.041	0.039
C	0.312	0.431	0.325	0.387	0.288	0.336	0.363	0.378	0.447	0.222	0.331	0.040

注：A：稀释后单抗；B：单抗与 TK1 阳性血清混合液；C：单抗与 TK1 阴性血清混合液；+：阳性对照；－：阴性对照

Note：A：diluted monoclonal antibody；B：monoclonal antibody and TK1 positive serum mixture；C：monoclonal antibody and TK1 negative serum mixture；+：positive response；－：negative response

3 讨论

TK1是DNA补救合成途径的关键酶。目前研究认为TK1可作为一种灵敏有效的肿瘤细胞增殖标志物。在近十年里，多个实验室制备了不同的抗TK1抗体用于肿瘤疾病的鉴定和监控，但灵敏度较低[5]。TK1的来源是业内积极研究和亟待解决的热点和难点。获取TK1抗原的方法有培养Raji细胞，从细胞提取物中纯化获得天然TK1蛋白[22]；有分析TK1抗原表位，合成N端23肽（3-25）、C端20肽（206-225）、C端28肽（198-225）等多肽段偶联生物大分子[5]；有利用重组载体pET28a-TK1诱导表达TK1重组蛋白[16]。本实验采用大肠杆菌pET32a表达系统，选用的pET32a表达载体可以实现蛋白的可溶性表达，his标签有利于目的蛋白从杂蛋白中分离纯化。与纯化天然蛋白相比得到的蛋白纯度更高；与合成多肽段偶联生物大分子相比，全蛋白作为抗原免疫动物获得的抗体特异性和灵敏度更高。在本实验方法下可以快速、大量获得优质的TK1蛋白。在肿瘤标志物研究和临床检测试剂的研制上有很好的应用前景。

4 结论

本实验成功构建能够表达TK1蛋白的重组菌BL21-pET32a-TK1，获得可溶性、抗原活性高、免疫原性强的TK1重组蛋白。为肿瘤科学及临床应用研究提

供了物质支撑。

参考文献

[1] Munch-Petersen B, Cloos L, Jensen HK, et al. Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells[J]. Adv Enzyme Regul, 1995, 35(1): 69-89.

[2] J.Kiran Kumar, A.C.Aronsson, G.Pilko, et al. A clinical evaluation of the TK 210 ELISA in sera from breast cancer patients demonstrates high sensitivity and specificity in all stages of disease[J]. Tumour Biol, 2016, 37(9): 11937-11945.

[3] Fabio Gasparri, Naining Wang, Sven Skog, et al. Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan™ assays[J]. European Journal of Cell Biology, 2009, 88(1): 779-785.

[4] Ke PY, Yang CC, Tsai IC, et al. Degradation of human thymidine kinase is dependent on serine-13 phosphorylation:involvement of the SCF-mediated pathway[J]. Biochem J, 2003, 370(1): 265–273.

[5] 周际, 李劲, 斯文·斯库格,等. 一种多表位 TK1 抗体的制备及其在评估肿瘤患者治疗效果中的应用[P].中国广东， CN102516390A, 2012-06-27.

[5] Zhou J, Li J, Skog S, et al. Preparation of a multi epitope TK1 antibody and its application in evaluating therapeutic effect of tumor patients[p]. Guangdong, China, CN102516390A, 2012-06-27.

[6] He E, Xu XH, Guan H, et al. Thymidine kinase 1 is a potential marker for prognosis and monitoring the response to treatment of patients with breast,lung,and esophageal cancer and non-Hodgkin’s lymphoma[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2010, 29(1): 4-6.

[7] Rausch S, Hennenlotter J, Teepe K, et al. Muscle-invasive bladder cancer is characterized by overexpression of thymidine kinase 1[J]. Urol Oncol, 2015, 33(10): 426-426.

[8] Gang Chen, Cheng He, Ling Li, et al. Nuclear TK1 expression is an independent prognostic factor for survival in pre-malignant and malignant lesions of the cervix[J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 249-249.

[9] Ying-Ying Du, Qiu-Jun Zhang, Guo-Ping Sun. Expression and clinical significance of cytokeratin-19 and thymidine kinase-1 in advanced gastrointestinal cancer[J]. Chinese Medical Journal, 2016, 129（18）: 2168-2172.

[10] 朱艳哲, 马泰, 张从军,等. 血清胸苷激酶 1 在肿瘤患者中的表达及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 1012-1015.

[10] Zhu YZ, Ma T, Zhang CJ, et al. The expression and clinical significance of serum thymidine kinase 1 in cancer patients[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2015, 50(7): 1012-1015.

[11] 刘秀菊,周际,李远,等. 一种新肿瘤生长相关生物标志物胸苷激酶 1 临床应用进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(1): 123-126.

[11] Liu XJ, Zhou J, Li Y,et al. Progress in clinical application of a new tumor growth related biomarker thymidine kinase 1[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2011, 25(1): 123-126.

[12] O’Neill KL, Zhang F, Li H, et al. Thymidine kinase 1—a prognostic and diagnostic indicator in ALL and AML patients[J]. Leukemia, 2007, 21(3): 560-563.

[13] Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, et al. Thymidine kinase:a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin’s lymphoma and a broad range of potential clinical applications[J]. Ann Hematol, 1992, 65(1): 1-5.

[14] He Q, Zou L, Li H, et al. Concentration of thymidine kinase 1 in serum (S-TK1) is a more sensitive proliferation marker in human solid tumors than its activity[J]. Oncology Reports, 2005, 14(4): 1013-1019.

[15] Wang Y, Jiang X, Dong S, et al. Serum TK1 is a more reliable marker than CEA and AFP for cancer screening in a study of 56,286 people [J]. Cancer Biomark, 2016, 16(4): 529-536.

[16] 庞丽君,王珊珊,吴云等.胸苷激酶1原核表达载体的构建表达及鉴定[J]. 医药论坛杂志, 2015, 36(8): 6-8.

[16] Pang LJ, Wang SS, Wu Y, et al. Construction, expression and identification of Thymidine kinase 1 prokaryotic expression vector[J]. J Medical Forum, 2015, 36(8): 6-8.

[17] 陈爱春,彭伟,汪生鹏. 亲和标签在重组蛋白表达与纯化中的应用[J].中国生物工程杂志, 2012, 32(12): 93-103.

[17] Chen AC, Peng W, Wang SP. Application of affinity tags in the expression and purification of recombinant proteins[J]. China Biotechnology, 2012, 32(12): 93-103.

[18] 任广威. 组氨酸标签蛋白纯化介质的合成及其应用研究[D]. 浙江杭州: 浙江工商大学, 食品科学与生物技术学院, 2011.

[18] Ren GW. Sythesis and application of his-tagged protein purification medium[D]. Zhejiang hangzhou: Zhejiang Gongshang University, college of food science and biotechnology, 2011.

[19] Markus S.Birringer, Remo Perozzo, Elvan Kut, et al. High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: quaternary structure,stability,and kinetics [J]. Protein Expression and Purification, 2006, 47(1): 506-515.

[20] 王云龙, 张春艳, 邓黎黎, 等. EB病毒融合蛋白Zta-P54在大肠杆菌中的表达、纯化及鉴定[J]. 生物技术通报, 2014, 7(1): 173-178.

[20] Wang YL, Zhang CY, Deng LL, et al. Expression,purification and identification of Zta-P54 fusion protein in escherichia coli of epstein-barr virus[J]. Biotechnology Bulletin, 2014, 7(1): 173-178.

[21] 葛新杰. NT-proBNP单克隆抗体的研制及ELISA定量检测方法的建立[D]. 河南郑州: 郑州大学, 生命科学学院, 2015.

[21] GE XJ. Development of monoclonal antibody NT-proBNP and establishment of ELISA quantitative detection method[D]. Henan Zhengzhou: Zhengzhou University, School of Life Science, 2015.

[22] 赵群莉. 血清胸苷激酶单克隆抗体酶促化学发光试剂盒的研制[D]. 天津: 天津医科大学, 免疫学, 2013.

[22] ZHAO QL. The development of the kit of the enzyme chemiluminescence detection for serum thymidine kinase with monoclonal antibody[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, immunology, 2013.